

## 1 研究テーマ

原始的動物”平板動物”の有性生殖機構の解明と胚発生条件の検討

## 2 研究の背景

平板動物は消化器官や神経細胞、筋細胞を持たない直径 1 mm、厚さ 15  $\mu\text{m}$  ほどの単純な海産無脊椎動物(図 1)であり、多細胞動物のなかでも初期に分岐した動物の 1 つである。その単純な見た目に反し、ミトコンドリアゲノム 16S rRNA 遺伝子配列に基づいて 20 種類のハプロタイプ(H0~H19)に分類されているが、それらハプロタイプが動物分類における属や種を反映しているのか不明であることに加えて形態学的にも分類することが難しい動物である。

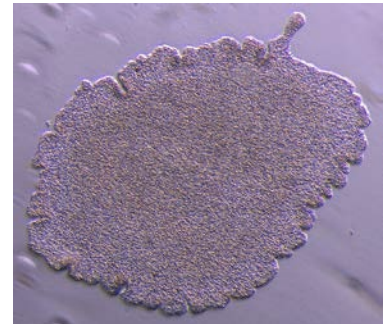


図1 平板動物

平板動物は小型かつ無色透明なために自然界で直接観察された報告はなく、これまでに平板動物の生活環について判明していることは少ない。その生殖様式としては無性生殖(分裂)のみが知られているが、有性生殖に関連する遺伝子がゲノム上に存在することや自然界から採取された個体の中には過密飼育して飢餓状態に曝すと個体内に卵母細胞が発生するものも存在するため特殊な環境下においては有性生殖を行う可能性も示唆されている。また、精子の存在が確認されないにもかかわらず、産卵後に胚発生(ただし、研究室内飼育系では 128 細胞期までの発生で停止することが報告されている)するため、精子以外の遺伝情報を伝達する手段を持っている可能性が考えられる。以上のことから平板動物の有性生殖機構に関して大きなギャップが存在しているのが現状である。

## 3 研究の着眼点と狙い

多細胞動物の有性生殖は配偶子を介したものや単為生殖などのバリエーションに富むが、本研究は原始的な動物である平板動物がこれまでに多細胞動物から報告のない個体間でのキメラ形成を介して有性生殖を行う可能性について着眼点を持って行われた研究である。原始的動物である平板動物の有性生殖機構を明らかにすることは、多細胞動物の祖先が現在のよう精子による遺伝情報伝達方法だけではなく、平板動物のようなキメラ形成を介した生殖様式も採用していた可能性を示唆し、多細胞動物の有性生殖の進化解明の一助になると考えられる。また、本研究から得られた成果は自然界から時折採取される卵母細胞を形成する個体が本研究で示されたようなキメラ形成により卵母細胞形成能を獲得している可能性を新たに提示するものであると考えられる。

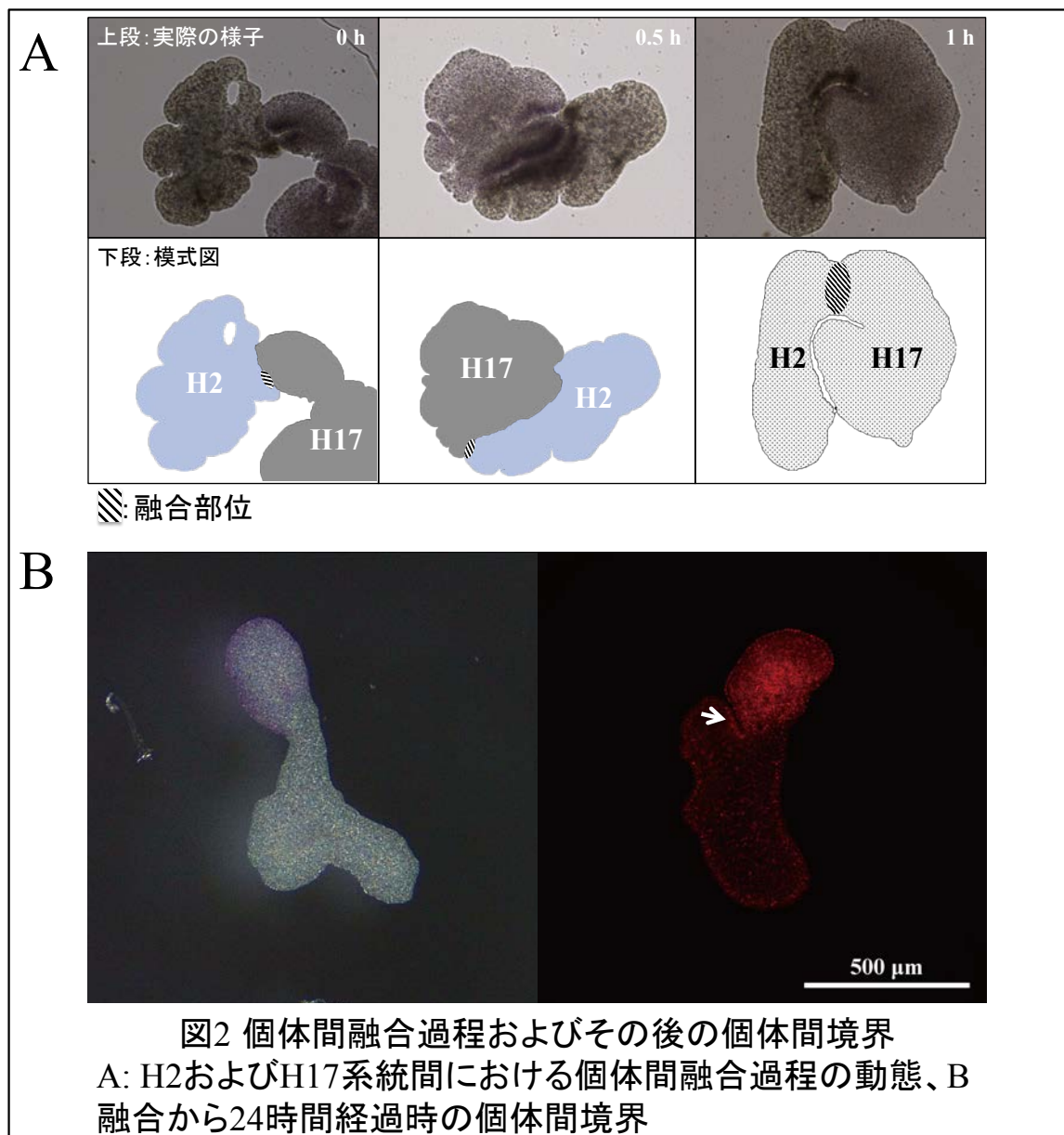
## 4 研究の方法

本研究で使用した日本産平板動物はハプロタイプ H2(2014 年飼育系統)、ハプロタイプ H2(2019 年飼育系統)、ハプロタイプ H17(2018 年飼育系統)の 3 系統であり、各系統はこれまで卵母細胞の形成が確認されていないものである。それぞれの系統間で物理刺激によって個体間融合を誘導し、その後の動態について観察を行なった。個体間融合後、1 ヶ月ほど個体を飼育し、その個体がキメラであることを H2 および H17 特異的プライマーによる解析で確認するとともに卵母細胞の形成から産卵および胚発生の過程を観察した。

## 5 研究の成果

### 5.1 個体間融合の誘導とその動態の観察

ガラス針(先端直径 60 $\mu$ m)を用いて各個体(H2: 2014 年飼育系統, H17: 2018 年飼育系統)を部分的に傷害し、接着させることで個体間の融合を促した。融合開始から約 1 時間経過すると



傷害箇所が修復されるとともに個体間の融合が完了した(図 2A)。融合が完了した直後には接着部位に由来する境界線が明瞭であることに加えて、H2 および H17 に由来する元の個体の部位が協調性なく動き、互いに離れようとする動きが高頻度に観察されたが、多くの個体では 24 時間後には融合直後に見られた境界線が消失し、1 個体として動き回る様子が観察された(図 2B 左)。また、一方の個体を蛍光核染色してから個体間融合を誘導し、その後の細胞動態の観察を行なったところ、境界線に近い部分の蛍光標識された細胞が未標識個体側に移動してきているため、徐々に各個体由来の細胞が混ざり合ってきていることがわかる(図 2B 右, 矢印)。本実験系では蛍光試薬が徐々に生体から排除あるいは消光のため平板動物由来の自家蛍光と区別することが難しくなり個体間融合から 2 日以降の細胞動態の観察を行うことができなかったが、その後 1 ヶ月程度飼育して増殖した個体から DNA を抽出し、H2 および H17 特異的なプライマーで PCR を行うと全ての個体から各々のハプロタイプ由来の遺伝子が検出された。したがって、個体間融合後にも両個体由来の細胞が安定して維持されていることから、ハプロタイプ H2 および H17 系統に由来する細胞をもつ「キメラ」となっていることが明らかとされた。

## 5.2 キメラ個体の卵母細胞形成

H2(2014 年飼育系統)、H2(2019 年飼育系統)、H17(2018 年飼育系統)のうち、いずれの組み合わせであっても安定して個体間融合を介したキメラを作出することができた。H2 同士の組み合わせのキメラでは 1 ヶ月以上飼育してもキメラ個体の形態に変化が見られなかった一方で、H2 と H17 の組み合わせのキメラは卵母細胞および卵黄を形成した(図 3A)。形成された卵母細胞は 3 週間ほどで直径 100 $\mu\text{m}$  の卵となり、多くの場合、受精膜を形成した状態で産卵されて胚発生を進めたが、卵を保有する一部の個体では産卵せずに体内で胚発生を進める行動が観察された(図 3B)。しかしながら、これまでの国外からの報告と同様にして産卵、体

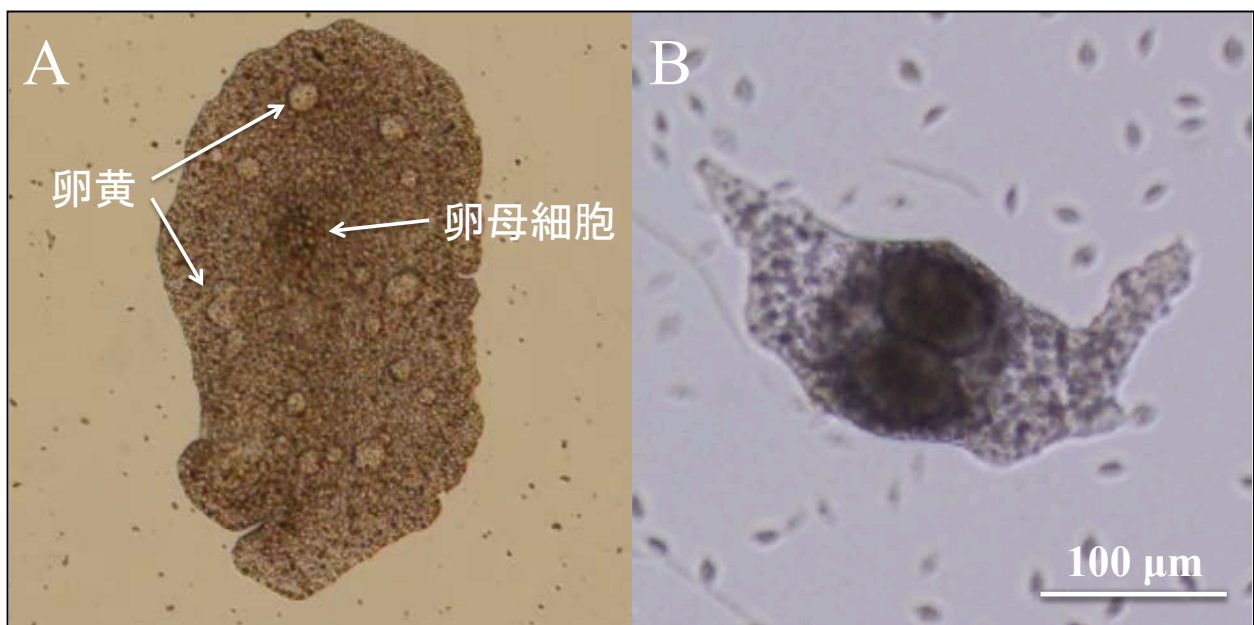
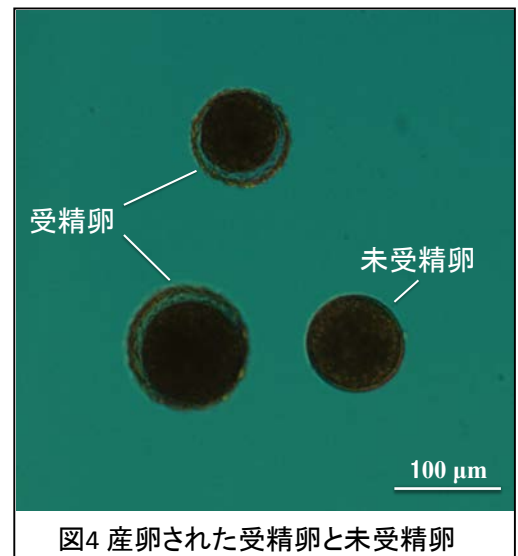


図3 卵母細胞の形成と胚発生

A: 卵母細胞と卵黄を形成するキメラ個体, B: 体内で胚発生(2細胞期)が進んでいる様子

内発生のいずれの場合でも胚発生は 64 細胞期までに停止して個体発生までに至らなかった。また、産卵された卵には受精膜の形成された受精卵と形成されていないと思われる未受精卵(成熟卵)が存在していることが明らかとなった(図 4)。卵母細胞を形成する以前から個体を隔離して飼育しても受精卵が得られるため、他個体から精子の供給を受けて受精膜を形成するとは考えづらく、成熟した卵を保有する平板動物の体内で受精膜を形成するような機構が存在することが示唆される。発生を進めた胚からは H2 と H17 系統の両方のミトコンドリア遺伝子が検出されることから卵母細胞形成過程か成熟卵を保有している間に細胞同士の融合が行われている可能性が高いが、このことが受精膜形成と関連しているのかは今後の研究により明らかにされる予定である。



## 6 まとめ

本研究では平板動物に物理的な刺激を与え、個体間融合を誘導すると卵母細胞を形成するキメラ個体を得ることができた。また、キメラ個体にはそれぞれの個体由来の細胞が長期間、少なくとも半年以上安定して維持され、その間に継続的に卵母細胞を形成するようになったことから、キメラ形成を介して卵母細胞形成能を獲得したと考えられる。キメラ形成はハプロタイプ H2 個体間(2014 年飼育系統×2019 年飼育系統)および H2 と H17 個体間(H2: 2014 年飼育系統 or H2: 2019 年飼育系統× H17: 2018 年飼育系統)のいずれでも観察することができたが、H2 と H17 系統間のみで卵母細胞形成が観察された。また、産卵された卵には受精膜の形成された受精卵と形成されていないと思われる未受精卵が存在していることから、親の体内で受精膜形成を誘導する機構が存在していると考えられる。個体から産卵された卵(受精卵)は胚発生を 64 細胞期まで進行させたが、それ以降の発生は観察することができなかった。しかし、胚から抽出した遺伝子を解析した結果、ハプロタイプ H2 および H17 の両方の個体由来の遺伝子が検出されることが明らかとなったため、各個体由来の細胞同士が卵母細胞形成の過程で融合している可能性、すなわち平板動物の有性生殖機構の一旦を解明できたと考えられる。

## 7 今後の展望

本研究により、平板動物の卵母細胞形成条件が個体間におけるキメラ形成であることがはじめて明らかとなった。加えて、同じハプロタイプ間では卵母細胞の形成が誘導されないことから、単純な物理刺激による誘導ではなく分子レベルで互いの細胞を識別し、卵母細胞を形成する機構が備わっていると考えられる。また、平板動物の胚からはハプロタイプ H2 および H17 の両方の由来の遺伝子が検出されるため、卵母細胞発生の過程で互いの細胞が融合している可能性が示唆される。本研究では、平板動物の有性生殖機構の一端を理解することができたと考えられるが、得られた胚はその発生を 64 細胞期で停止してしまい、個体発生ま

でに至っていない。したがって、今後はさらに平板動物を採取して様々なハプロタイプ間でキメラ形成を誘導し、それら胚発生を観察や発生条件の検討を行うことで個体発生過程を明らかにすることができると考えられる。また、これまでに国外から①自然界から採取される個体のなかに複数の他個体由来の遺伝子を持つものがあること、②卵母細胞を形成する個体と形成しない個体の差が生じる原因の2点について報告および議論がなされてきたが、本研究で明らかにされたキメラ形成を介した性成熟及び卵母細胞形成誘導は、上記2つの現象をはじめて関連づけるものとなった(図5)。

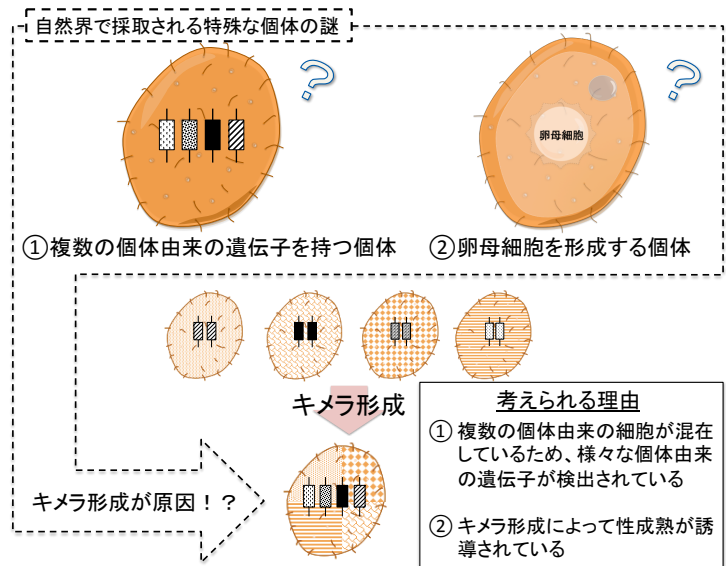


図5 自然界から採取される特殊な平板動物

本研究は平板動物の有性生殖機構がキメラ形成を介するものである可能性を提示するだけでなく、これまでに報告されてきた平板動物の生態にも踏み込んだものとなる。本研究が平板動物の基礎生物学的研究の大きなブレイクスルーとなり得ることが期待される。

## 8 研究成果の発信方法（予定を含む）

平成30年度 日本動物学会 中部支部大会にて本研究成果の発表を行った。また、今年9月に開催される Marine Biotechnology Conference 2019 および International Workshop "At the roots of bilaterian complexity: insights from early emerging metazoans"にて本研究成果を発表予定である。本年度中に本研究成果を論文として投稿を目指している。

1. ○埴 宗継、小田賢幸 「研究室内飼育下における日本産平板動物の観察」、『平成30年度 日本動物学会 中部支部大会』、愛知県名古屋市、2018年12月
2. ○Munetsugu Bam and Toshiyuki Oda 「Vitellogenin accumulation in yolk during oogenesis in the simplest free living animal placozoans」, 『Marine Biotechnology Conference 2019』, Shizuoka, September 2019
3. ○BAM, M. and ODA, T. 「DETECTION AND CHARACTERIZATION OF THE MAJOR YOLK PROTEIN VITELLOGENIN FROM OUTSIDE YOLK IN A JAPANESE PLACOZOAN」, 『International Workshop "At the roots of bilaterian complexity: insights from early emerging metazoans"』, Tutzing, September 2019